



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

ANA CRISTINA AMORIM FERREIRA CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DA
QUIMIOCINA CXCL-10, O SOROTIPO VIRAL, O *STATUS*
IMUNE DO HOSPEDEIRO E A GRAVIDADE DAS FORMAS
CLÍNICAS DA DENGUE**

JOÃO PESSOA-PB

2017

ANA CRISTINA AMORIM FERREIRA CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DA
QUIMIOCINA CXCL-10, O SOROTIPO VIRAL, O *STATUS*
IMUNE DO HOSPEDEIRO E A GRAVIDADE DAS FORMAS
CLÍNICAS DA DENGUE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Paraíba como pré-requisito para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Orientadora: Prof. Dra Joelma Rodrigues de Souza

JOÃO PESSOA-PB

2017

C376a Cavalcante, Ana Cristina Amorim Ferreira.

Associação entre os níveis séricos da quimiocina cxcl-10, o sorotipo viral, o status imune do hospedeiro e a gravidade das formas clínicas da dengue / Ana Cristina Amorim Ferreira Cavalcante. -- João Pessoa, 2017.

38f.: il. -

Orientadora: Joelma Rodrigues de Souza.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Dengue. 2. CXCL10. 3. Imunopatologia. 4. Farmacologia. 5. Ciências Farmacêuticas.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616.936(043.2)

ANA CRISTINA AMORIM FERREIRA CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DA
QUIMIOCINA CXCL-10, O SOROTIPO VIRAL, O *STATUS*
IMUNE DO HOSPEDEIRO E A GRAVIDADE DAS FORMAS
CLÍNICAS DA DENGUE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
coordenação do Curso de Farmácia da Universidade
Federal da Paraíba como pré-requisito para obtenção do
título de Farmacêutico Generalista.

João pessoa, 24 de Novembro de 2017.

Profa. Dr^a. Joelma Rodrigues de Souza
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Lucio Roberto Cançado Castellano
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Profa. Dr^a. Priscilla Anne Castro de Assis
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tens feito em minha vida. O senhor é tão incrível, que até dos pequenos detalhes, tem cuidado de mim. Obrigado pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelos amigos que chegaram durante esta caminhada, e pelos erros que me ensinam muito mais que as vitórias.

A minha família por todos os esforços para garantir meus estudos, principalmente minha mãe Aurilene e meus tios Ednaldo e Daiana, vocês são minha vida, e tenho o orgulho de ter um pouco de cada um de vocês em mim.

A minha querida amiga da universidade, Girlene, que mesmo com todos os obstáculos esteve cada dia ao meu lado. Contribuindo com sua paciência, seu sorriso, e o carinho que conquista tudo e todos.

A minha orientadora Joelma Rodrigues de Souza, que desde a primeira aula me cativou e que acreditou em meu potencial, depositando sua confiança e orientação para este projeto.

A todos os docentes do curso de Farmácia, professores da UFPB, Campus I, pelo conhecimento transmitido.

Aos órgãos, HULW, LACEN-PB, e ETS, apoiadores desta pesquisa que contribuíram e permitiram a realização deste trabalho.

RESUMO

A dengue é uma das mais importantes arboviroses estudadas, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde um grave problema de saúde pública. A doença pode ser causada por um dos quatro sorotipos, antigenicamente distintos do vírus dengue (DENV- 1, DENV-2, DENV-3 e DENV- 4), pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, causando desde uma doença febril indiferenciada até formas graves com extravasamento de plasma. Neste aspecto, vários mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas são produzidos na vigência da infecção e podem contribuir em sua imunopatologia. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar a associação entre os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 e a gravidade das formas clínicas da dengue, relacionando-os com o sorotipo viral e o *status* imune do hospedeiro. Indivíduos caracterizados clínica e laboratorialmente por dengue (n=80) foram admitidos no setor de doenças infectocontagiosas do HULW/UFPB no período de 2009 a 2012, e tiveram suas amostras sanguíneas coletadas na fase aguda e de convalescência visando a realização de exames laboratoriais específicos como a RT_PCR para diagnóstico dos sorotipos, determinação dos anticorpos IgM e IgG anti-dengue visando a caracterização do *status* imune do hospedeiro e a dosagem da quimiocina CXCL-10/IP-10 por ELISA. Os dados clínicos e laboratoriais foram compilados e submetidos a análise estatística considerando $\alpha=5\%$. Os resultados revelaram que entre os pacientes estudados, 18,15% foram diagnosticados com infecção primária, 53,75% com a forma clínica dengue clássica (DC), 45% com febre hemorrágica de dengue (FHD) e 1,25% com dengue clássica complicada (DCC). O sorotipo viral DENV-1 foi detectado em 8,75% dos pacientes, seguido de 5% dos indivíduos com DENV-2, 37,5% dos pacientes com DENV-3. Não houve detecção do sorotipo DENV-4. Análises de associação entre a dosagem da quimiocina e o *status* imune do hospedeiro, as formas clínicas e o sorotipo viral foram realizadas. Conclui-se que embora todos os pacientes com dengue tenham níveis detectáveis da quimiocina estudada, as associações não revelaram diferenças estatísticas significativas. Acredita-se que características inerentes do hospedeiro, da cepa viral infectante, e o momento da avaliação clínica podem ter limitado as conclusões deste estudo. Assim, novas abordagens devem ser realizadas com o objetivo de se identificar o papel da CXCL-10 no desfecho clínico da dengue, contribuindo para o entendimento da patogenia da doença e no possível desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da doença.

Palavras-chave: Dengue. CXCL10. Imunopatologia.

ABSTRACT

Dengue is one of the most important arboviruses studied, being considered by the World Health Organization a serious public health problem. The disease can be caused by one of the four antigenically distinct serotypes of the dengue virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) belonging to the genus *Flavivirus*, *Flaviviridae* family, from undifferentiated febrile disease to forms with extravasation of plasma. In this regard, several inflammatory mediators, cytokines and chemokines are produced during the lifetime of the infection and may contribute to their immunopathology. Thus, the present work aimed to investigate the association between serum levels of CXCL-10 and the severity of clinical forms of dengue, relating them to the viral serotype and host immune status. Individuals characterized clinically and laboratorially due to dengue (n = 80) were admitted to the HULW / UFPB infectious-contagious diseases sector from 2009 to 2012, and their blood samples were collected in the acute and convalescence phase, aiming at specific laboratory tests RT_PCR for serotype diagnosis, IgM and anti-dengue IgG antibodies determination to characterize the host immune status and the CXCL-10 / IP-10 chemotherapy dosage by ELISA. The clinical and laboratory data were compiled and submitted to statistical analysis considering $\alpha = 5\%$. The results showed that among the patients studied, 15 were diagnosed with primary infection, 43 with classic clinical dengue (CD), 36 with dengue hemorrhagic fever (DHF) and 1 with complicated classical dengue fever (CHD). The DENV-1 viral serotype was detected in 7 patients, followed by 4 subjects with DENV-2, 3 patients with DENV-3. There was no detection of DENV-4 serotype. Analyses of association between chemokine dosage and host immune status, clinical forms and viral serotype were performed. However, although all patients with dengue have produced the chemokine studied, the associations revealed no significant statistical differences. It is believed that inherent characteristics of the host, the infecting viral strain, the timing of the clinical evaluation or our n sample may have limited the conclusions of this study. Thus, new approaches should be performed with the objective of identifying the role of CXCL-10 in the clinical outcome of dengue, contributing to the understanding of the pathogenesis of the disease and the possible development of biomarkers of diagnosis and prognosis of the disease.

Keywords: Dengue. CXCL10. Immunopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1. Mapa Global de Consenso de áreas de risco para a dengue (referente ao período de 01/10/2016 a 30/01/2017). Os pontos vermelhos que se encontram na figura são referentes as notificações de dengue em casos locais. E a escala de cores indica a probabilidade de risco de se adquirir a doença. Fonte: Ferreira (2017).....	4
Figura 2. Ciclo de reprodução do DENV no homem. Fonte: Adaptado de Rice et al. (2007). 7	
Figura 3. Ciclo de vida do mosquito Aedes aegypti. Fonte: Adaptado de CECOM/UNICAMP, 2016.....	8
Figura 4. Classificação sugerida dos níveis de gravidade da dengue. Fonte:OBO, M.R.G. et al., 2013. Adaptado de Manual de Dengue (WHO, 2009).	11
Figura 5. Distribuição por sexo dos pacientes com dengue avaliados no período de 2009/2012 no HULW/UFPB. Fonte: Autoria própria.	17
Figura 6. Distribuição dos pacientes quanto ao status imune. Fonte: Autoria própria.....	18
Figura 7. Distribuição dos pacientes quanto as manifestações clínicas. Fonte: Autoria própria.	18
Figura 8. Distribuição dos pacientes quanto ao sorotipo viral. Fonte: Autoria própria.	19
Figura 9. Associação entre os níveis séricos da CXVL-1010 e status imune da dengue. Fonte: Autoria própria.	20
Figura 10. Associação entre os níveis séricos da CXCL-10 e sorotipo viral. Fonte: Autoria própria.	20
Figura 11. Associação entre os níveis séricos da CXCL-10 e as manifestações clínicas. Fonte: Autoria própria.	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DENV	Dengue vírus
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific icam-grabbing non-integrin</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
REG	Retículo endoplasmático rugoso
FHD	Febre hemorrágica da dengue
DC	Dengue Clássica
SCD	Síndrome do choque da dengue
SE	Semana epidemiológica

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	9
RESUMO	9
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	I
FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	II
SUMÁRIO	III
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Epidemiologia da dengue.....	3
2.2 A biologia do vírus dengue a sua transmissão	5
2.3 Ciclo de replicação viral.....	6
2.4 Os vetores da dengue.....	7
2.5 Patogênese da dengue.....	9
2.6 Manifestações clínicas e diagnóstico da dengue	9
2.7 Mediadores inflamatórios	11
2.8 Quimiocinas.....	12
2.9 Quimiocina CXCL-10	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 População de estudo e aspectos éticos	14
3.2 Reação em cadeia da polimerase pela ação da transcriptase reversa - RT-PCR... 14	
3.3 Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da dengue.	15
3.4 Classificação clínica dos pacientes em tipo de infecção (Status imune).	15
3.5 Dosagem da quimiocina CXCL-10 por teste imunoenzimático.....	15
3.6 Fonte e Análise de dados.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das mais importantes arboviroses estudadas, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde um grave problema de saúde pública. Estima-se que anualmente ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue no planeta e que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos (ROQUE; SANTOS; MEDEIROS, 2016).

Evidências científicas sugerem que o vírus dengue (DENV) possa ter origem no continente asiático, embora exista dificuldade de confirmar que se tratava da doença pelos dados clínicos escassos. Devido aos grandes deslocamentos populacionais este vírus pode ser encontrado nos demais continentes, possuindo assim, uma grande capacidade de adaptação aos ambientes urbanos (FERNANDES, 2010).

No Brasil, a primeira epidemia documentada ocorreu entre o ano de 1981 e 1982 em Boa Vista, Roraima (BARRETO; TEXEIRA, 2008). Desde então o país sofre com sucessivas epidemias levando em consideração a característica que vetores artrópodes apresentam em disseminar-se, rapidamente, uma vasta área territorial, o que facilita sua transmissão, o que ressalta a dinâmica de ocorrência em ciclos sazonais da doença, em épocas quentes e de alto grau de umidade. Pode-se entender facilmente essa característica sazonal da dengue ao relacionar os dados dos boletins epidemiológicos obtidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, onde no ano de 2016, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue no país, com 861 casos de dengue grave e 8.402 casos de dengue com sinais de alarme confirmados (BRASIL, 2016). Desses, 35.688 casos prováveis de dengue foram contabilizados na Paraíba, com 7 óbitos confirmados (PARAÍBA, 2016). Este ano, o país registrou 219.040 casos prováveis de dengue até a 35ª Semana Epidemiológica, com 184 casos de dengue grave e 1.913 casos de dengue com sinais de alarme confirmados (BRASIL, 2017). Na Paraíba, no período de 1º de janeiro a 02 de setembro deste ano (35ª SE), foram notificados 2.618 casos prováveis de dengue. Neste período, apenas um óbito por dengue foi confirmado (PARAÍBA, 2017).

A infecção pelo vírus DENV provoca uma ampla gama de sintomas clínicos, o diagnóstico laboratorial precoce e preciso é essencial para o tratamento adequado e o possível sucesso na terapêutica dos pacientes. A detecção do vírus e a conversão

sorológica têm sido os principais objetivos da avaliação diagnóstica durante muitos anos, porém as reações cruzadas entre os *Flavivírus* tem sido um problema em fornecer um diagnóstico diferencial. Além disso, não existe um biomarcador de diagnóstico único e definitivo que esteja presente durante todo o período de infecção do paciente, particularmente naqueles que sofrem da infecção secundária por dengue. No entanto, o desenvolvimento e comercialização de testes capazes de detectar marcadores presentes em diferentes estágios de infecção como a proteína não-estrutural viral 1 (NS1) e imunoglobulina M simplificaram bastante o diagnóstico laboratorial da dengue. Apesar destes avanços, permanecem desafios significativos no manejo clínico de pacientes infectados, especialmente na ausência de biomarcadores confiáveis (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Entre os mediadores produzidos na dengue, alguns estudos apontam para a quimiocina CXCL-10/IP-10. Contudo, esses estudos são incipientes e não conclusivos, quanto ao real papel deste mediador na imunopatogênese da infecção. Foram detectados níveis elevados desta quimiocina em pacientes com forma grave da doença em relação aos controles saudáveis (DE-OLIVIERA-PINTO et al., 2012). Em acréscimo, análises de associação entre infecções primárias e secundárias da dengue, bem como entre formas clínicas com e sem sinais de alarme foram realizadas com esta quimiocina, porém sem resultados estatísticos significativos (RATHAKRISHNAN et al., 2012) Portanto, estudos escassos e a indefinição acerca do papel da quimiciona CXCL-10/IP-10 na infecção humana pelo DENV justificam a realização desta pesquisa.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre os níveis séricos da quimiciona CXCL-10 e a gravidade das formas clínicas da dengue, relacionando-os com o sorotipo viral e o *status* imune do hospedeiro.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a população de estudo quanto aos aspectos demográficos e epidemiológicos;

- Determinar os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 na população de estudo;
- Correlacionar os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 com as diferentes formas clínicas da dengue;
- Correlacionar os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 com o sorotipo viral identificado;
- Correlacionar os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 com o *status* imune do hospedeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da dengue

A dengue é a arbovirose que mais cresce no planeta. Os fatores de risco para esta doença infecciosa são temperatura, umidade, índices de precipitação, saneamento básico, e qualidade na prevenção dos vetores em áreas urbanas. Hoje, a dengue se tornou endêmica em mais de 100 países (Fig. 1), destacando a região das américas e o sudeste asiático dentre as mais afetadas (WHO, 2016).

A maioria das arboviroses se detém a infecção em animais, podendo acometer acidentalmente o homem. Como podemos ver o vírus DENV apesar de ser um arbovírus se mostra uma exceção em relação aos outros de sua classe, pois se adaptou muito bem ao hospedeiro humano, observando que em epidemias periódicas múltiplos sorotipos circulam em uma determinada área, processo este denominado hiperendemicidade (FIGUEREDO, 2003; GUBLER, 2004). Outro ponto importante quando se fala em surtos epidêmicos é lembrar que o mosquito transmissor é sensível as mudanças de clima e temperatura e isto afeta diretamente a transmissão viral, pela intensa proliferação do inseto vetor em épocas quentes e com alto grau de umidade (SILVA, 2016).

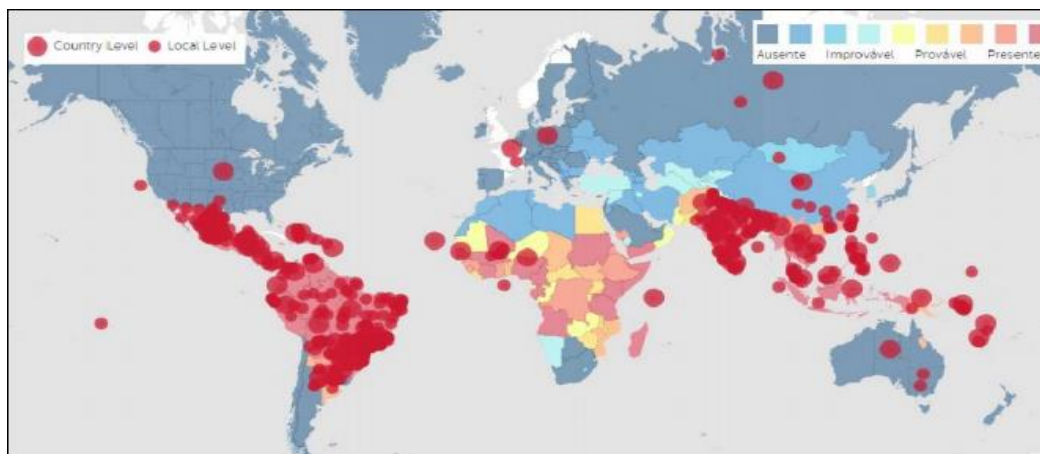


Figura 1. Mapa Global de Consenso de áreas de risco para a dengue (referente ao período de 01/10/2016 a 30/01/2017). Os pontos vermelhos que se encontram na figura são referentes as notificações de dengue em casos locais. E a escala de cores indica a probabilidade de risco de se adquirir a doença. Fonte: Ferreira (2017).

No Brasil, durante a década de 1950, o mosquito *Aedes Aegypti* havia sido considerado erradicado com ajuda do epidemiologista Oswaldo Cruz que promoveu no país uma campanha intensa contra o vetor afim de controlar a febre amarela (CHAGAS, 2008) Nos anos posteriores a OMS declarou o país livre do mosquito, porém os países próximos não conseguiram o mesmo resultado, o que levou a reentrada do vetor durante os anos seguintes. Os pesquisadores recentes não utilizam mais a expressão “erradicação” porque o Brasil é um país muito grande, e com o passar dos anos a globalização contribui para entrada e saída de várias pessoas no território, o que mostrou que seria quase impossível exterminá-lo (SANTOS, 2001.)

Tem ocorrido principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste do país, aumento significativo no número de casos de dengue. Em 2016 foram notificados 1.500.535 casos no Brasil, sendo a região Sudeste aquela que apresenta o maior número de notificações (858.273 casos; 57,2%) seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 20,8%), Centro-Oeste (220.966 casos; 17,7%), Sul (56.187 casos; 3,8%) e Norte (34.110 casos; 2,3%) (BRASIL, 2016). O aumento do número das taxas de notificação pode ser explicado pela maior conscientização da doença entre a sociedade e os profissionais da saúde. A dengue é uma doença que traz consigo uma carga muito grande nos países onde se encontra endêmica, sendo esta carga tanto financeira como humanística refletindo no poder público a necessidade de estratégias que visam o monitoramento dos casos e o controle das epidemias. Em países que atualmente

não são afetados pela doença também é importante estar em alerta a medida que pode ocorrer introdução do vírus através da imigração (MARTELLI et al., 2015).

2.2 A biologia do vírus dengue e sua transmissão

Arbovirose é o termo utilizado para infecções virais cujos agentes precisam de um inseto artrópode hematófago para completar seu ciclo de vida. São mundialmente cerca de 500 arbovírus distribuídos no planeta, apresentando maior frequência em locais que contribuam para seu ciclo de vida como regiões tropicais com clima favorável para sua transmissão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012). O DENV é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Esta família apresenta o maior número de espécies com importância médica. No país, são encontradas diversas espécies de *Flavivirus*, entre elas os sorotipos do DENV, ZIKAV, o vírus da febre amarela (LIMA-CAMARA, 2016)

A família *Flaviviridae* representa um importante grupo de vírus envelopados cujo genoma é constituído por RNA de fita simples positivo, envolto pelo capsídeo (C) icosaédrico que possui a membrana que o circunda derivada da célula hospedeira, e nesta membrana estão inseridas as proteínas do envelope (E), proteínas da membrana (M) ou pré-membrana (prM) e ainda proteínas não estruturais (NS)(LEITMEYER; VAUGHN, 1999). Os hospedeiros humanos são os principais alvos do vírus da dengue e a transmissão se dá pela picada de fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Aedes* (HOLMES; TWIDDY, 2003)

A transmissão do vírus da dengue ocorre inicialmente a partir da picada do mosquito em uma pessoa contaminada na fase de viremia, que começa um dia anterior ao surgimento da febre e segue até o sexto dia da doença, onde o vírus presente na circulação sanguínea é ingerido pelo artrópode. Como a infecção viral em humanos resulta em uma alta viremia, as partículas virais são facilmente transmitidas entre mosquitos e humanos, sem necessidade de outro hospedeiro (WHITEHEAD et al., 2007). A partir do momento da picada a fêmea possui o vírus em seu interior, porém não pode ainda transmitir o mesmo. Durante cerca de 10 dias, o vírus acaba por se disseminar no organismo do mosquito, onde se multiplica e invade suas glândulas salivares, onde se reproduz e permanece deixando a fêmea infectiva

durante toda a sua vida. Durante a picada, a saliva contendo os vírus entra em contato com a corrente sanguínea do indivíduo sadio, que pode então contrair as possíveis enfermidades (DA SILVA CORDEIRO, 2008).

2.3 Ciclo de replicação viral

Após a inoculação do vírus através da picada do vetor, a disseminação viral segue o trajeto dos linfonodos locais, células musculares, e fibroblastos, posteriormente o microrganismo permanece na forma livre no plasma sanguíneo ou no interior de células da linhagem fagocítica mononuclear, onde as células dendríticas localizadas no tecido epitelial conhecidas como células de Langerhans mostram mais permeáveis a infecção. É interessante ressaltar o tropismo que o DENV possui por células fagocitárias, já sendo evidenciado o início da ativação do sistema imune (CLYDE et al., 2006). O processo de replicação viral pode ser dividido nas seguintes etapas: Adsorção, penetração, desnudamento, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais (PINHO, 2013). A adsorção à célula hospedeira ocorre pela endocitose mediada por receptor, com destaque à molécula CD209 ou DC-SIGN presente em células dendríticas (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003). O receptor é alvo de uma glicoproteína viral, glicoproteína E, que contém sítios para promover sua ligação ao receptor. Após a ligação a partícula viral é internalizada em uma vesícula endossomal, o pH baixo no interior do endossomo promove uma mudança conformacional na glicoproteína E que permite a mesma promover uma fusão das membranas viral e endossomal, o que possibilita posteriormente o nucleocapsídeo ser liberado no citoplasma da célula hospedeira e também a liberação do genoma viral (SOARES, 2013).

A tradução do genoma viral ocorre em associação com compartimentos intracelulares, no Retículo Endoplasmático Rugoso (REG) os produtos levaram a produção das proteínas como também o genoma das novas partículas virais (Figura 2). A montagem destas novas partículas também é feita no REG, e uma vez finalizadas seguem para superfície da organela onde recebem a membrana lipídica e são direcionadas ao complexo de golgi para então serem exocitadas. Antes mesmo de terminar o processo de exocitose, ocorre maturação da partícula viral permitindo a mesma o caráter infeccioso (MUKHOPADHY et al., 2005). A duração deste ciclo pode

variar de quatro a sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção humana (URCUQUI-INCHIMA et al., 2010).

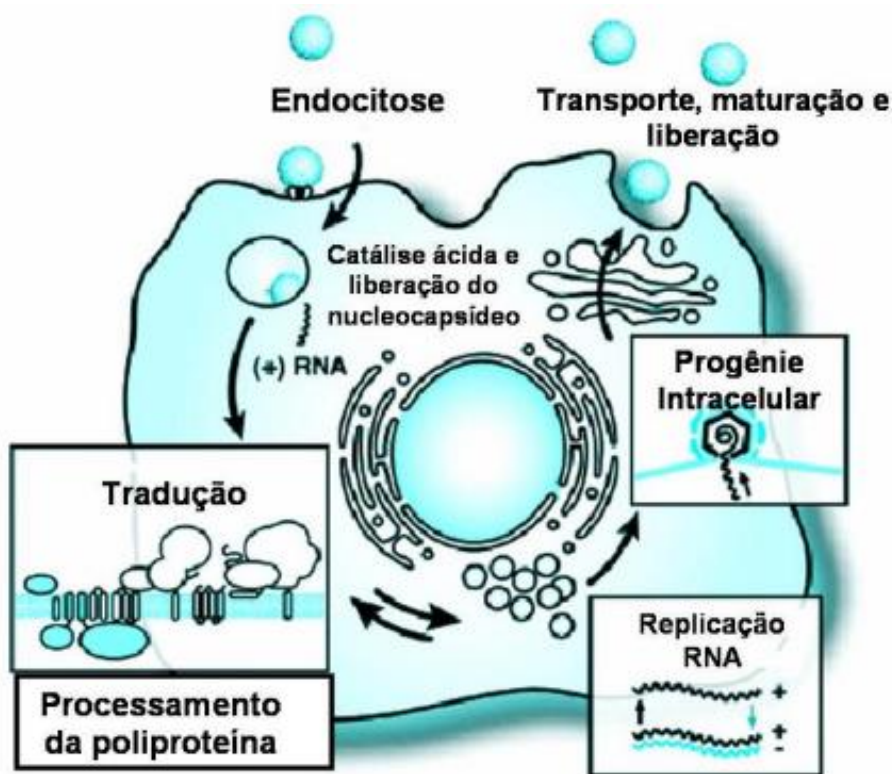


Figura 2. Ciclo de reprodução do DENV no homem. Fonte: Adaptado de Rice et al. (2007).

2.4 Os vetores da dengue

Os mosquitos *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* são as duas espécies de maior importância como vetores do DENV. Pertencentes a ordem Díptera, a família *Culicidae* e ao gênero *Aedes*, as espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* foram introduzidas em nosso continente devido as rotas de comércio e as navegações marítimas, provenientes da África trazendo escravos (NEVES et al., 2011). Ambas as espécies que inicialmente apresentavam hábitos restritos ao ambiente natural, como troncos de árvores conseguiram com o passar dos anos adaptar-se ao meio urbano, tornando-se um mosquito com hábitos domésticos. Vivendo em residências ou ao redor das mesmas em locais públicos, estabelecimentos e escolas onde possam encontrar uma condição favorável à sua procriação. A fêmea deposita seus ovos em água parada e limpa, porém estudos mostram a possibilidade de depósito de seus

ovos em águas relativamente sujas, ricas em matéria orgânica (FORATTINI, 2002; FUNDO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

O mosquito *Aedes aegypti* mede menos de 1 centímetro e possui uma aparência inofensiva, coloração preta e manchas brancas (Figura 3) Apenas a fêmea apresenta-se hematófaga, atividade necessária para maturação dos ovos, onde o principal horário do repasto sanguíneo é durante o amanhecer e o entardecer, destacando-se como um mosquito de hábito diurno. Porém a adaptação do mosquito *Aedes* se mostrou tão surpreendente a ponto de passar a modificar seus hábitos, podendo picar mais durante a noite, em função da mudança de rotina dos hospedeiros que passam a chegar em seus domicílios mais tarde (FIOCRUZ, 2017). Após a alimentação, a fêmea realiza a postura dos ovos, que podem sobreviver no ambiente por meses até a chegada das épocas com alto grau de pluviosidade. Em contato com a água, os ovos sofrem eclosão e liberaram as larvas que posteriormente originam as pupas que dão origem ao inseto adulto. Estudos apontam que entre cada alimentação e postura dos ovos, ocorre um intervalo em média de 3 dias. (FNS, 2011).

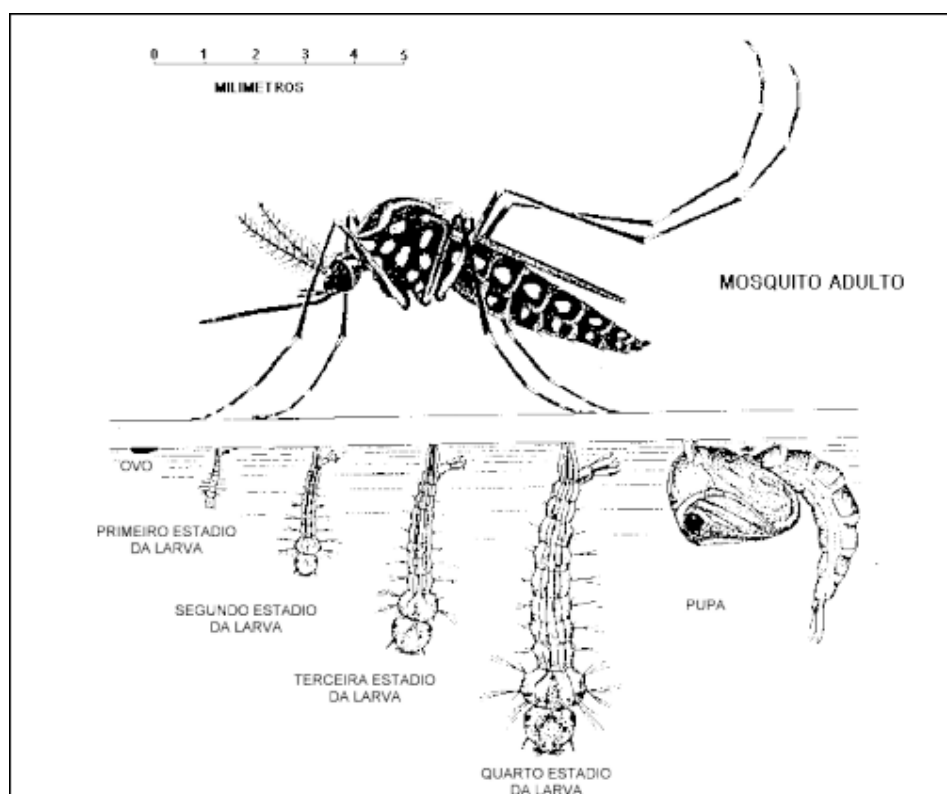


Figura 3. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Adaptado de CECOM/UNICAMP, 2016.

2.5 Patogênese da dengue

Apesar dos avanços nos últimos anos, muitos fatores relacionados a patogênese da infecção pelo DENV, ainda precisam ser elucidados. O desafio para os estudos se dá pela complexa relação entre os fatores inerentes ao hospedeiro e os fatores virais. Durante a infecção independente do sorotipo DENV uma vez a pessoa infectada, ela terá anticorpos Ige que conferem imunidade duradoura para este sorotipo (CLYDE et al., 2006; GUBLER, 1998).

Quando infectada por um sorotipo diferente, ocorre reação cruzada com anticorpos pré-existentes que se ligam ao vírus formando imunocomplexos, mas como estes anticorpos não são capazes de neutralizar o novo sorotipo, após serem internalizados via receptores *Fc* por células imunes podem promover sua replicação no interior celular. O número de células infectadas aumenta e consequentemente o número de linfócitos T ativados também. Estas células secretam citocinas inflamatórias e promovem ativação de fragmentos do sistema complemento como C3a e C5a, que agem diretamente na permeabilidade vascular e se relacionam com a gravidade clínica (KURANE, 2007).

2.6 Manifestações clínicas e diagnóstico da dengue

As infecções pelo vírus DENV (1-4) podem se apresentar por um amplo espectro de manifestações, sendo elas formas assintomática e sintomática, a última pode se manifestar por meio de duas formas clínicas principais: a Febre do dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD), com ou sem síndrome do choque da dengue (SCD). Sendo a dengue clássica ou febre do dengue caracteriza por um estado febril autolimitado associado a diversos sintomas como náuseas, enxaqueca, e mialgia (Quadro 1) Quando ocorre a evolução do quadro clínico e o paciente apresenta uma grave plaquetopenia, acompanhada de diversos quadros hemorrágicos caracterizava a febre hemorrágica da dengue. (MARTELLI et al., 2015).

FD/FHD	Grau	Sinais e Sintomas	Laboratoriais
DC		Febre com dois dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Dor de cabeça. • Dor retro-orbital. • Mialgia. • Artralgia / dor óssea. • Erupção cutânea. • Manifestações hemorrágicas. • Nenhuma evidência de extravasamento plasmático. 	<ul style="list-style-type: none"> • Leucopenia (≤ 5000 células / mm³). • Trombocitopenia $< 150\ 000$ células / mm³). • Aumento do hematócrito (5% - 10%). • Nenhuma evidência de extravasamento de plasma.
FHD	I	Febre e manifestações hemorrágicas (teste de torniquete positivo) e evidência de extravasamento de plasma.	Trombocitopenia $< 100\ 000$ células / mm ³ Aumento de HCT $\geq 20\%$.
FHD	II	Apresentando o grau I mais sangramento espontâneo.	Trombocitopenia $< 100\ 000$ células / mm ³ Aumento de HCT $\geq 20\%$
FHD	III	Apresentando grau I ou II mais falha circulatória (pulso fraco, pressão de pulso estreita (≤ 20 mmHg), hipotensão, inquietação).	Trombocitopenia $< 100\ 000$ células / mm ³ Aumento de HCT $\geq 20\%$.
FHD	IV	Apresentando grau III mais choque profundo e pulso indetectável.	Trombocitopenia $< 100\ 000$ células / mm ³ Aumento de HCT $\geq 20\%$.

Figura 4. Classificação das infecções por dengue e classificação da gravidade da FDH. Fonte:. Adaptado de Manual de Dengue (WHO, 1999).

Contudo na prática esta classificação se tornava difícil de ser aplicada, o que levou a Organização Mundial da Saúde em 2009 a mudar o sistema de classificação. Os casos de dengue são classificados atualmente em dengue grave e não grave, sendo que os casos de dengue não grave podem ainda sim serem subdivididos em com e sem sinais de alerta (Organização Mundial da Saúde, 2009). A dengue com e sem sinais de alerta se caracteriza apresentando sintomas semelhantes as outras infecções virais, onde se manifesta com um quadro gripal e uma febre alta de início súbito, este estado febril é autolimitado seguindo-se o período crítico de desfevescência e, por fim, a fase de recuperação. Geralmente dura de quatro a sete dias e pode estar associado a mialgia, náuseas, astenia e calafrios (DEEN et al., 2006) Uma pequena parte dos casos segue um curso diferente evoluindo para a dengue grave que além da sintomatologia anteriormente citada, entre o terceiro e o sétimo dia de doença, ocorre intensificação das dores, acompanhadas de graves manifestações hemorrágicas que são consequência do extravasamento do plasma relacionados a inflamação dos vasos próximos a instalação do vírus (GUBLER, 1998). A plaquetopenia ocasiona no organismo uma mudança na homeostase que passa a ter tendências hemorrágicas. O extravasamento plasmático ocasiona insuficiência circulatória e outras complicações, que podem evoluir para choque hipovolêmico e

morte. (KURANE; TAKASAKI, 2001). A figura 4 apresenta novos critérios que determinam a gravidade da doença, essa mudança trouxe consigo uma grande melhora no atendimento do paciente com dengue.

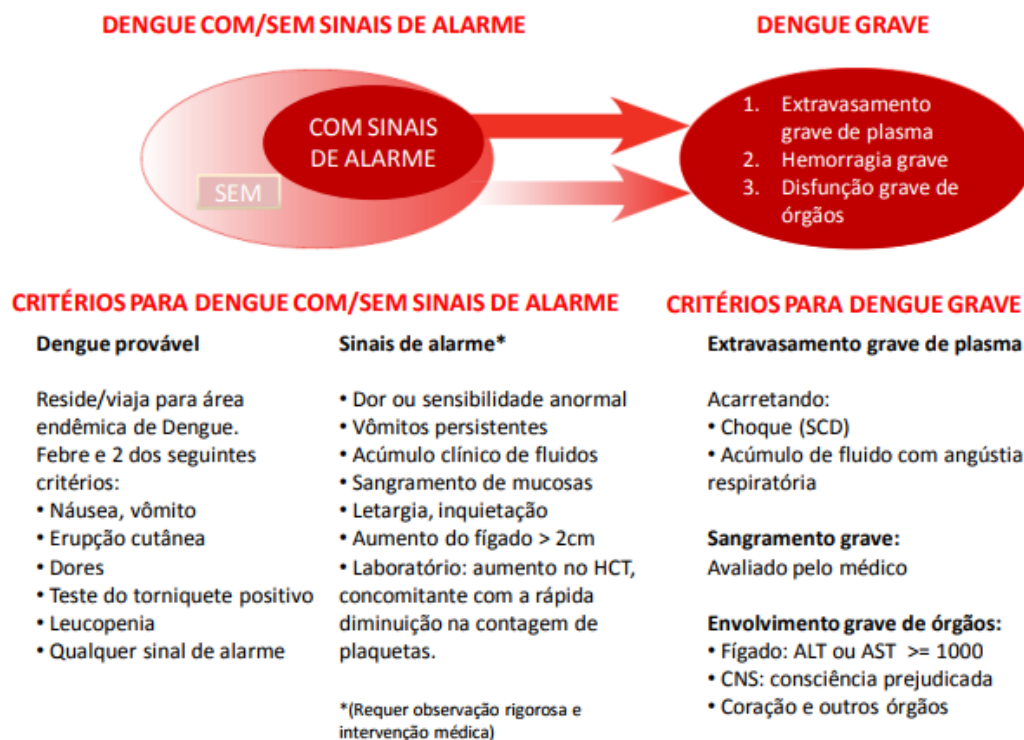


Figura 4. Classificação sugerida dos níveis de gravidade da dengue. Fonte:OBO, M.R.G. et al., 2013. Adaptado de Manual de Dengue (WHO, 2009).

2.7 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios são produzidos a partir de células ativadas por fragmentos antigênicos e/ou imunológicos e se caracterizam como pequenas moléculas solúveis que podem atuar a nível local e sistêmico (MARGOLIUS, 1995; NATHAN, 2002). Durante a infecção pelo vírus, os mediadores inflamatórios teriam papel na ativação de células da imunidade inata, o que ajudaria na diminuição da viremia, porém a produção exacerbada de mediadores pode levar um efeito negativo, quando ativa o endotélio e leva ao extravasamento plasmático observado nos pacientes com a doença. (GANDINI, et al., 2014). Dentre os mediadores temos as citocinas, que são proteínas liberadas fisiologicamente desempenhando inúmeras

funções, como regulação do sistema imune, maturação de órgãos linfáticos e células na medula óssea, ativação ou supressão de diferentes respostas. O desempenho das citocinas na imunopatogênese do DENV é de extrema importância, uma vez que o processo da resposta se inicia a partir da liberação elevada de citocinas derivadas da interação de células inatas com linfócitos T ativados (MESQUITA, 2010).

Durante o início da infecção podemos encontrar concentrações de TNF- α , IL-2 e IL-6 elevadas, pois são originadas da resposta Th1 que ocorre durante os primeiros dias da doença, enquanto as citocinas IL-10, e IL-4 são derivadas de respostas Th2, podem ser encontradas posteriormente esse período. Durante comparação entre soro de pacientes com quadros graves e pacientes apresentando a forma clássica da dengue (FD) permite verificar a expressão de muitos receptores para citocinas que estão relacionadas com a gravidade da doença tanto em infecções primárias como em secundárias. Dentre estas citocinas as mais encontradas são IL-6, IL-8, IL-10 IFN- α , IFN- β , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-13. Em quadros de dengue também é observado alteração na via de sinalização da IL-12, sendo que esta citocina é responsável pelas respostas imunes protetoras contra diversos patógenos e age potencializando a resposta Th1 com isso suprime a produção da IL-10, esta supressão está relacionada a melhora de sintomas em pacientes apresentando a forma grave da doença. (SINGLA, 2016) .

2.8 Quimiocinas

As quimiocinas são peptídeos (8-16kDa) que recebem esta nomenclatura por exercerem atividade de quimiotaxia, direcionando o tráfego das células do sistema imune para os locais da inflamação por ação de gradientes de concentração. Porém estas moléculas também agem na ativação de leucócitos e outros tipos celulares teciduais e estão envolvidas tanto na inflamação, como na homeostase do organismo. (LOCATI et al., 2002). Durante o estado inflamatório, as quimiocinas apresentam outras atividades como angiogênese, fibrose, apresentação e eliminação de antígenos (LOCATI et al., 2002; DORNER et al., 2009).

Essas substâncias pertencem a classe das citocinas, porém se diferenciam por se ligarem a receptores acoplados a proteína G-GPCR (VIOLA; LUSTER, 2008). Podem ser classificadas de acordo com sua estrutura em quatro famílias: C, CC, CXC,

e CX3C e também podem ser classificadas de acordo com sua função, se estão participando de reações inflamatórias são chamadas de quimiocinas inflamatórias, e são produzidas por diversos tipos celulares em resposta a estímulos como patógenos e citocinas pró-inflamatórias. As quimiocinas homeostáticas estão presentes na fisiologia normal do organismo agindo em diversos tecidos. Muitas quimiocinas possuem ambas as atividades sendo classificadas a parte, onde são chamadas de quimiocinas mistas (JOHNSON et al., 2004).

2.9 Quimiocina CXCL-10

A proteína 10 induzível por interferon gama (IP-10) (também conhecida como CXCL10) é uma quimiocina de 10 kDa, pertencente à família CXC, que é secretada por uma variedade de células, incluindo monócitos, células endoteliais, e fibroblastos em resposta a IFN-gama. (KAPLAN, 1987). Ainda que tenha sido identificado com base na sua indução pelo IFN-gama, o IP-10 também pode ser induzido por IFN-alfa, como é o caso das células dendríticas. A CXCL-10 também está presente em células de Langerhans e células endoteliais em respostas de hipersensibilidade de tipo tardio (DTH) em humanos (MOLESWORTH-KENYON; OAKES; LAUSCH, 2005). A expressão de IP-10 também pode ser induzida em células do sistema nervoso central por estímulos tais como IFN-gama, vírus e bactérias. Sua principal atividade desempenhada é a regulação e controle de leucócitos durante o processo inflamatório, mas foi proposto que esta quimiocina estaria presente no recrutamento e potencialização da atividade Th1 (STRIETER et al., 1995)

O receptor para CXCL-10 foi identificado como CXCR3, um receptor acoplado a proteína G transmembranar. Nos linfócitos T foi observado alta expressão do receptor em células Th1, o que leva a considerar a possibilidade desta quimiocina promover um domínio Th1 sobre a resposta Th2, e em concentrações elevadas quando ocorre o desequilíbrio da resposta Th1/Th2. Dois outros ligantes para CXCR3 são: CXCL9 e CXCL11. A ligação de IP-10 a CXCR3 medeia mobilização de cálcio e posterior quimiotaxia. Este receptor foi identificado numa variedade de diferentes condições inflamatórias e autoimunes, incluindo doença de graves, tireoidite de Hashimoto, aterosclerose e diabetes mellitus. Além do IFN-gama, esta citocina também pode ser induzida por estímulos pro-inflamatórios como TNF- α , ou por

partículas como vírus e outros produtos microbianos (CASSATELLA et al., 1997).

3 METODOLOGIA

3.1 População de estudo e aspectos éticos

Pacientes atendidos no setor de Doenças infecto contagiosas do Hospital Universitario Lauro Wanderley (DIC/HULW/UFPB) no período de 2009-2012, foram caracterizados clínico e laboratorialmente como infectados pelo DENV. Esses pacientes foram convidados a participarem deste estudo e emitiram concordância através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todo o projeto seguiu com base na Resolução nº. 466 de 12 de dezembro de 2012 sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde/Brasília/2012, obtendo parecer favorável no Comitê de Ética e Pesquisa do HULW sob CAEE 0031.0.126.000-09.

Para definição do diagnóstico, os indivíduos participantes deste projeto, após avaliação clínica, tiveram suas amostras sanguíneas (10 ml) coletadas em tubo sem anticoagulante na fase aguda (1-5º dia de detecção da doença) visando a realização de exames laboratoriais específicos, como a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT_PCR) para diagnóstico dos sorotipos (LANCIOTTI et al., 1992) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para IgM (Biomanguinhos TM) e IgG (PanBioTM) anti-dengue. Adicionalmente, nova amostra de sangue foi coletada em tubo sem anticoagulante na fase de convalescência (15º dia de doença), para determinação dos anticorpos IgM e IgG anti-dengue visando a caracterização do *status* imune do hospedeiro (primária/secundária). O sangue coletado foi centrifugado 500xg/15 min para obtenção do soro, ficando este acondicionado a -80°C até sua utilização. Todas as informações contendo os dados clínicos e laboratoriais e os resultados desta pesquisa foram compiladas em um banco de dados para posterior análise estatística.

3.2 Reação em cadeia da polimerase pela ação da transcriptase reversa - RT-PCR

A identificação viral foi realizada pela reação em cadeia da polimerase pela ação da transcriptase reversa – RT-PCR e reconhecimento dos produtos de PCR por

eletroforese. A extração do RNA viral das amostras de soro foi realizada através do kit de purificação (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen™) conforme recomendação do fabricante. A seguir, as amostras foram submetidas à transcrição reversa conforme descrito em Lanciotti et al., 1992. Eletroforese em gel de agarose 2% corada com brometo de etídeo foi utilizada para identificação dos produtos de PCR (cDNA). (FERNANDES, 2012)

3.3 Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da dengue.

Os anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram detectados nas amostras de soro dos pacientes conforme recomendações dos fabricantes (Biomanguinhos™ e PanBio™, respectivamente). Brevemente, placas sensibilizadas com anticorpos de captura anti-isotipo de Ig, receberam as amostras de soro contendo os anticorpos, que após incubação de 2h e, posterior lavagem, receberam o conjugado enzimático com antígenos de DENV. A seguir, as placas foram incubadas por 1h a TA, e após lavagem, o substrato enzimático foi adicionado. Após 30 min, a reação foi interrompida e a absorbância de cada poço determinada em 405nm. (FERNANDES, 2012)

3.4 Classificação clínica dos pacientes em tipo de infecção (*Status* imune).

A infecção pelo DENV foi classificada em primária ou secundária em observação aos títulos de anticorpos IgM e IgG mensurados por ELISA e RT-PCR, conforme descrito por Cordeiro et al. (2007). A infecção primária é caracterizada pela ausência de anticorpos IgG dengue-específico e pela presença de anticorpos IgM anti-dengue, ambos detectados por teste imunoenzimático, e detecção do RNA viral por RT-PCR. A infecção secundária é caracterizada por detecção de IgG em amostras de fase aguda e ausência de IgM anti-dengue, associada com RT-PCR positiva, seguida pela presença de IgM em amostras na fase da convalescência. (FERNANDES, 2012)

3.5 Dosagem da quimiocina CXCL-10 por teste imunoenzimático.

Placas de poliestireno de alta afinidade (MaxiSorp Nunc®) foram sensibilizadas com 70uL de solução de anticorpos monoclonais para captura de quimiocina CXCL-10 humana diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,3 e incubadas por 18

horas a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS acrescido de Tween 20 (Sigma®) e incubadas com 200µL de solução de PBS contendo 2% de albumina bovina – BSA (Sigma®), para o bloqueio dos sítios inespecíficos por 2 horas a TA. Após, foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween 20. Prosseguiu-se então à adição de 100µL das amostras e do padrão de citocinas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2h. E a seguir, lavadas novamente por 6x com PBS-Tween 20. Em seguida, 100µL de solução do respectivo anticorpo monoclonal conjugado à biotina (1ug/mL OptiEIA Kit - R&D Systems – USA®) foram adicionados. Após duas horas, as placas foram lavadas e novamente incubadas por 1h com 80µL estreptoavidina conjugada à peroxidase. Em seguida a atividade enzimática foi revelada pela adição de 100µL por poço do substrato por 30 min. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Promega) com filtro de 405nm. Os resultados foram expressos em pg/mL, obtidos por regressão linear a partir de uma curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas da citocina recombinante (OptiEIA Kit - R&D Systems – USA®).

3.6 Fonte e Análise de dados

Análise de associação entre os diferentes grupos: *status* imune (infecção primária x secundária); formas clínicas, sorotipo viral e os níveis séricos da quimiocina CXCL-10 foram realizadas através de teste t de Student para amostras não pareadas e/ou análise de variância. O teste não paramétrico de KruskalWallis foi usado para análise comparativa entre os grupos. Os resultados foram apresentados considerando-se o erro alfa de 5%. Havendo diferença entre os grupos, o teste pos hoc Dunn foi realizado. Todos os resultados foram compilados no software SigmaStat® versão 4.0 para Windows.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, apresentam-se os resultados da associação da quimiocina CXCL-10, o sorotipo viral, o status imune do hospedeiro e a forma clínica da dengue apresentados pelos 80 pacientes atendidos no período de 2009/2012 no HULW/UFPB

com diagnóstico clínico e laboratorial de dengue. Esta pesquisa é fruto de um projeto que visa contribuir para o entendimento dos aspectos imunopatológicos da dengue, avaliando diferentes marcadores inflamatórios. Estes marcadores podem estar envolvidos na evolução das formas clínicas da doença, podendo ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico da mesma. Análise dos resultados revelou que a maioria da população estudada pertencia ao sexo feminino (Figura 5) e apresentava idade variando entre 01-81 anos. Essa característica pode ser explicada pelo contexto onde as mulheres em sua maioria permanecem mais tempo dentro de suas residências, onde, portanto são expostas a focos do inseto vetor, além do que sabe-se que as mulheres possuem uma maior preocupação em procurar os profissionais da saúde que os homens, o que dificulta um trabalho epidemiológico correto (BRASILINO et al., 2017.).

Quando se avaliou a distribuição das amostras por status imune do hospedeiro (Figura 6), e as manifestações clínicas (Figura 7) nossos resultados revelaram que a maioria dos pacientes apresentaram infecções secundárias e pertenciam a um grupo classificado como dengue clássica (DC).

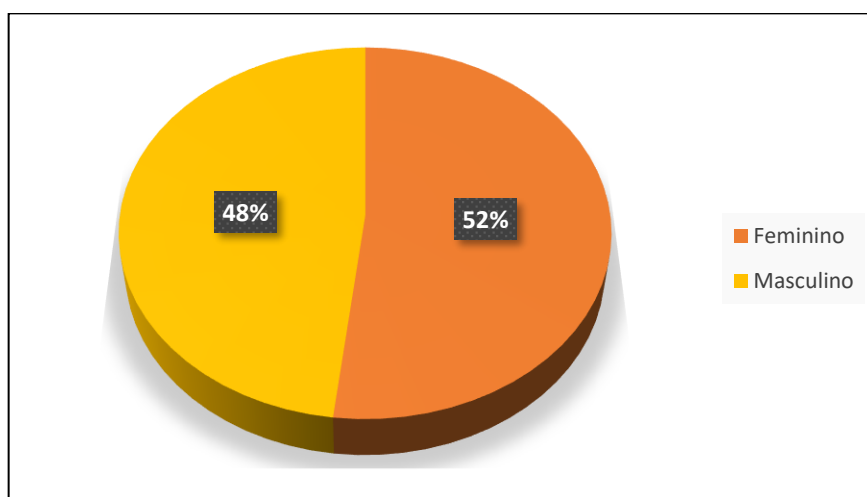


Figura 5. Distribuição por sexo dos pacientes com dengue avaliados no período de 2009/2012 no HULW/UFPB. Fonte: Autoria própria.

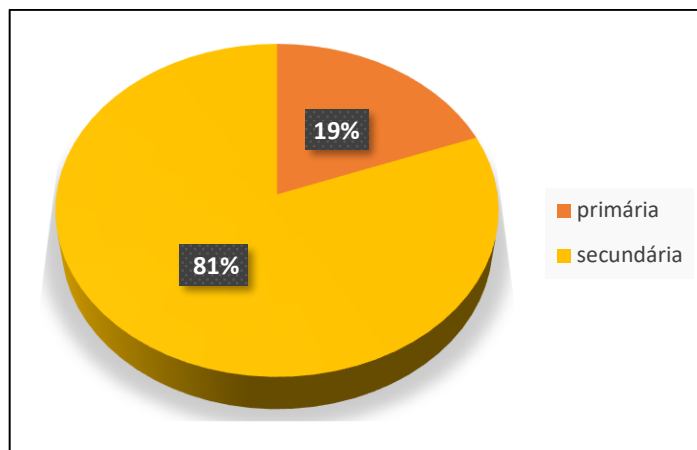


Figura 6. Distribuição dos pacientes quanto ao status imune. Fonte: Autoria própria.

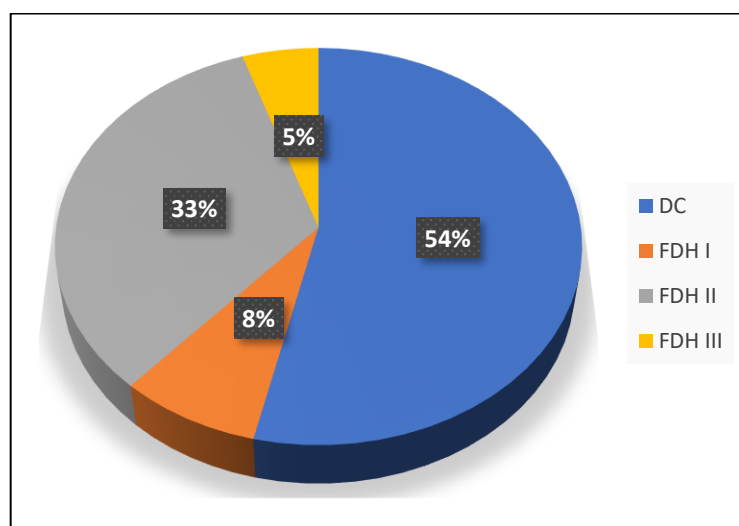


Figura 7. Distribuição dos pacientes quanto as manifestações clínicas. Fonte: Autoria própria.

Quando se avaliou a distribuição da amostragem estudada por sorotipo viral, percebe-se que na maioria das amostras, não foi possível se identificar a sorotipagem. No entanto, quando o sorotipo pode ser identificado, a maioria dos pacientes apresentaram infecções por DEN-1 (Figura 8). A quimiocina CXCL-10/IP-10 foi dosada no soro dos pacientes com dengue e posteriormente associada com as formas clínicas, o tipo de infecção e o sorotipo viral. Nossos resultados revelaram que a infecção pelo dengue induziu a produção da quimiocina independente do sorotipo ou status imune do hospedeiro ou forma clínica.

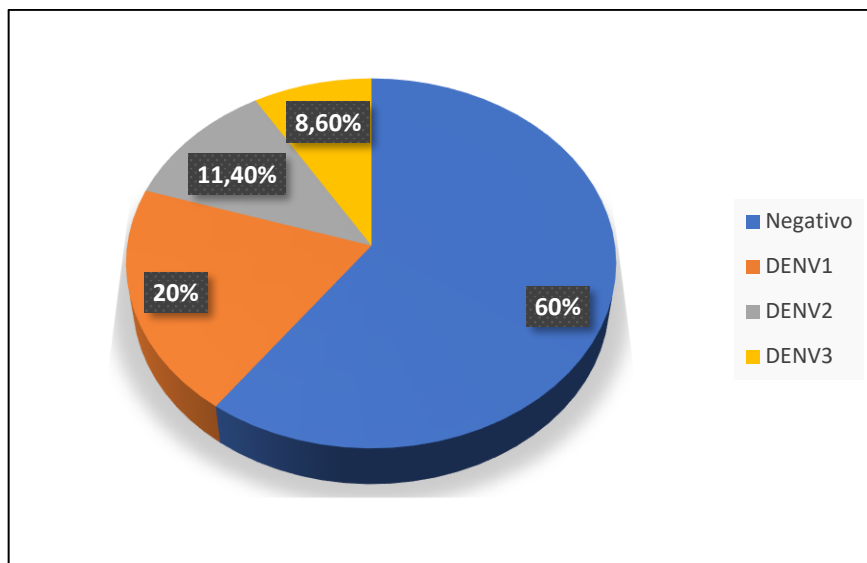


Figura 8. Distribuição dos pacientes quanto ao sorotipo viral. Fonte: Autoria própria.

Desta forma, não houve diferença estatística entre as associações realizadas (Figuras 9, 10, 11). Sabe-se que os quatro sorotipos distintos de DENV cocirculam nos locais endêmicos. A imunidade a um sorotipo não proporciona proteção contra os sorotipos heterólogos, e a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos DENV pode provocar desde uma infecção indiferenciada a uma doença aguda febril (dengue clássica- DC), ou uma doença grave caracterizada por extravasamento de plasma, trombocitopenia e diatéses hemorrágicas (Febre hemorrágica da dengue - FHD) e choque hipovolêmico (síndrome do choque da dengue - SCD) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999). Adicionalmente, a infecção pelo DENV têm sido associada a produção de diferentes mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas que contribuem para a vasculopatia e a gravidade da infecção (LOBO et al., 2014; MORITA et al., 2011).

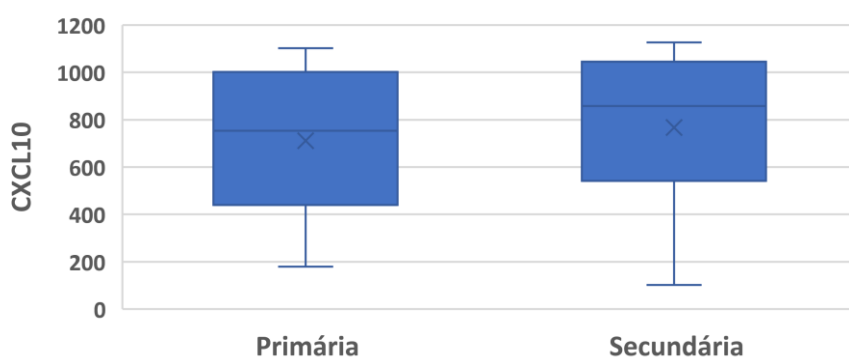


Figura 9. Associação entre os níveis séricos da CXVL-1010 e *status* imune da dengue. Fonte: Autoria própria.

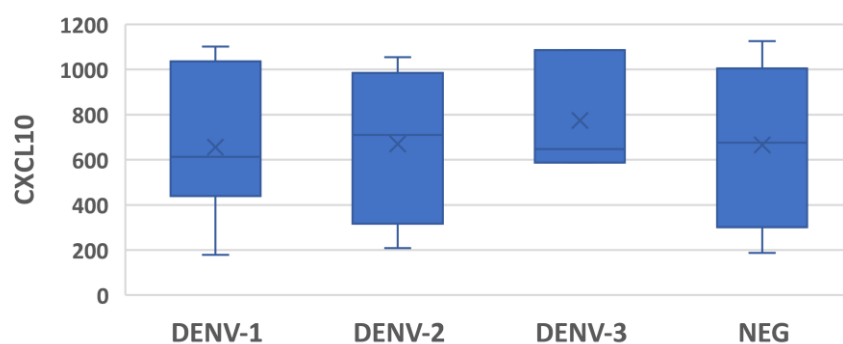


Figura 10. Associação entre os níveis séricos da CXCL-10 e o sorotipo viral. Fonte: Autoria própria.

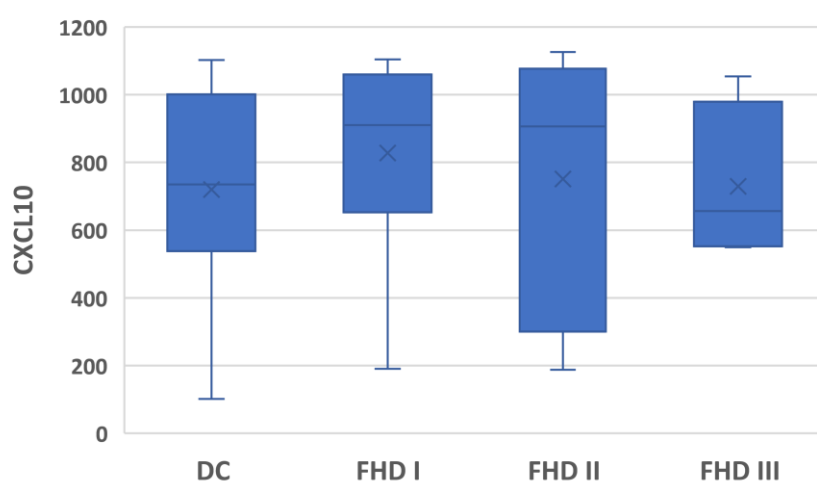


Figura 11. Associação entre os níveis séricos da CXCL-10 e as manifestações clínicas. Fonte: Autoria própria.

Entre os diferentes mediadores inflamatórios produzidos na vigência da infecção pelo DENV, alguns trabalhos apontam para a participação da quimiocina

CXCL-10. Assim, Dejnirattisai et al. (2008) observaram níveis elevados deste mediador em pacientes com FHD quando comparados aos pacientes DC. No entanto, Rathakrishnan et al. (2012) analisaram a associação desta quimiocina com a dengue sem e com sinais de alerta, e em infecção primária e secundária. Os autores não encontraram diferença estatística nas associações, embora os valores estivessem elevados, mostrando sua produção durante a infecção. Em outro estudo, níveis elevados da CXCL-10 foram encontrados em pacientes que apresentaram a forma grave da dengue quando comparados com indivíduos saudáveis, que não demonstraram expressão da quimiocina ou a apresentaram muito baixa (DE-OLIVIERA-PINTO et al., 2012). Em acréscimo, Her et al. (2017) demonstraram níveis significativamente maiores em infecções secundárias do DENV que podiam estar associadas ao extravasamento do plasma em pacientes adultos infectados pelo vírus. Outro ponto é que Gomes Fialho et al. (2017) encontraram níveis circulantes elevados da CXCL-10 em pacientes infectados pelo DENV-4 quando comparados aos indivíduos saudáveis.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, percebe-se que a dengue continua sendo uma grave afecção de grande relevância para saúde pública. No presente estudo, houve co-circulação dos sorotipos DENV-1-3, com predomínio de infecções secundárias e na população do sexo feminino. Em acréscimo, conclui-se que apesar da quimiocina CXCL10 estar presente em níveis elevados nos pacientes com dengue, não foi possível associar sua presença com as formas clínicas, o sorotipo viral e o status imune do hospedeiro. Acredita-se que características inerentes do hospedeiro, da cepa viral infectante, o momento da avaliação clínica ou o nosso n amostral podem ter limitado as conclusões deste estudo. Contudo, novos estudos devem ser elaborados com o objetivo de se identificar o papel da CXCL-10 no desfecho clínico da dengue, contribuindo para o entendimento da patogenia da doença e no possível desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da dengue.

REFERÊNCIAS

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue fever: a call for local, national, and international action. **Lancet**, v. 372, n. 9634, p.205, 2008.

BRASIL SdVeS, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico até a 35ª Semana Epidemiológica**. v. 48, n. 29, 2017.

CORDEIRO, M. T.; SILVA, A. M.; BRITO, C. A.; NASCIMENTO, E. J.; MAGALHÃES, M. C.; GUIMARÃES, G. F.; LUCENA-SILVA, N.; DE CARVALHO, E. M.; MARQUES, E. T. JR. Characterization of dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 1128-1134, 2007.

BRASILINO, C. E. M.; DOS SANTOS, C. D. S.; PINHEIRO, F. A.; BATISTA, F. T. L.; DE SOUZA, T. V. T.; DE OLIVEIRA, L. L. Determinantes sociais da saúde e os casos de dengue no município de quixadá-ce no período de 2010 a 2015. **Mostra Interdisciplinar do curso de Enfermagem**, v. 2, n. 1, 2017.

DEJNIRATTISAI, W.; DUANGCHINDA, T.; LIN, C. L.; VASANAWATHANA, S.; JONES, M.; JACOBS, M.; MALASIT, P.; XU, X. N.; SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5865-5874, 2008.

DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GANDINI, M.; FREITAS, L. P.; SIQUEIRA, M. M.; MARINHO, C. F.; SETÚBA, S.; KUBELKA, C. F.; CRUZ, O. G.; DE OLIVEIRA, S. A. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, p. 48–56, fev. 2012.

FERREIRA, R. A.; DE OLIVEIRA, S. A.; GANDINI, M.; FERREIRA, L. C.; CORREA, G.; ABIRAUDE, F. M.; REID, M. M.; CRUZ, O. G.; KUBELKA, C. F. Circulating

cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. **Acta Tropica**. v. 149, p. 138–147, set. 2015.

FIALHO, L. G.; TORRENTES-CARVALHO, A.; CUNHA, R. V.; FARIA, N.; GANDINI, M.; CIPITELLI, M.; DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M.; AZEREDO, E. L.; KUBELKA, C. F. Induced nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) detection in circulating monocyte subsets from Brazilian patients with Dengue-4 virus. **Virology Reports**, v. 7, p. 9-19, 2017.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores. **Acta Med Port**, v. 24, n. 4, p. 967-976, 2011.

HER, Z.; KAM, Y. W.; GAN, V. C.; LEE, B.; THEIN, T. L.; TAN, J. J.; SIGN IMMUNOMONITORING PLATFORM; LEE, L. K.; FINK, K.; LYE, D. C.; RÉNIA, L.; LEO, Y. S.; NG, L. F. Severity of Plasma Leakage Is Associated With High Levels of Interferon γ -Inducible Protein 10, Hepatocyte Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2), and MMP-9 During Dengue Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 1, p. 42-51, 2017.

HOLMES, E.C. The evolution and epidemiology of dengue virus. **Salud Publica Mexico**, Cuernavaca, v. 49, p. 296-300, 2007.

LOBO, M. R. G.; FURTADO, S. C.; JÚNIOR, J. R. G.; DE PAULA, L.; BARCELLOS, J. F. M. Citocinas na dengue: inovações do sistema imune. **Scientia amazonia**, v. 3, p. 25-40, 2014.

ESPADA-MURAO, L. A.; MORITA, K. Dengue and soluble mediators of the innate immune system. **Trop med health**, v. 39, n. 4, p. 53-62, 2011.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 2, p. s89–95, mar. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue**: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New Edition. WHO: França, 2009. 147 p.

PARAÍBA. SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2016. **Novo boletim dengue, zika e chikungunya**. Disponível em: < <http://paraiba.pb.gov.br/saude-divulga-novo-boletim-da-dengue-zika-e-chikungunya/>>. Acesso em: 06 de abr. de 2017.

ROQUE, A. C. M.; SANTOS, P. F. B. B.; MEDEIROS, E. R. Perfil epidemiológico da dengue no município de Natal e região metropolitana no período de 2007 a 2012. **Revista Ciência Plural**, v. 1, n. 3, p. 51-61, 2016.

DA SILVA, R. V. **Dengue e vetor**: dois agentes biológicos e sua história no estado do Paraná. Curitiba. 2004.

BORGES, S. M. A. A. Importância epidemiológica do Aedes Albopictus nas Américas. 2001. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MOLESWORTH-KENYON, S. J.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N. A novel role for neutrophils as a source of T cell-recruiting chemokines IP-10 and Mig during the DTH response to HSV-1 antigen. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 4, p. 552-559, 2005.

HARDAKER, E. L.; BACON, A. M.; CARLSON, K.; ROSHAK, A. K.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT, D. B.; BUCKLEY, P. T.; COMEGYS, M.; PANETTIERI JR., R. A.; SARAU, H. M.; BELMONTE, K. E. Regulation of TNF- α -and IFN- γ -induced CXCL10 expression: participation of the airway smooth muscle in the pulmonary inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. **The FASEB journal**, v. 18, n. 1, p. 191-193, 2004

STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; ARENBERG, D. A.; BURDICK, M. D.; KASPER, J.; DZUIBA, J.; VAN DJ, WALZ. A.; MARRIOTT, D. The functional

role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **J.Biol.Chem**, v. 270, p. 27348–27357, 1995.

CASSATELLA, M. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BERTAGNIN, A.; LUSTER, A. D.; MCDONALD, P. P. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. **Eur.J.Immunol**, v. 27, n. 1, p. 111–115, jan. 1997.

SOUSA, L. B. **Estudo de infestação por Aedes aegypti na epidemiologia de dengue e percepção da população de Rio Claro, SP sobre aspectos da doença**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON, R. C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2003.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

DA SILVA CORDEIRO, J. Vírus dengue em larvas de Aedes aegypti e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 6, p. 986-991, 2008.

CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

PINHO, A. C. O. **Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2013.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of medical research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M. A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D. L.; STEINMAN, R. M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 197, n. 7, p. 823- 829, 2003.

LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; REY, F. A.; DESPRES, P.; ARENZANASEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

MUKHOPADHY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 13-22, 2005.

URCUQUI-INCHIMA, S.; PATINO, C.; TORRES, S.; HAENNI, A. L.; DIAZ, F. J. Recent developments in understanding dengue virus replication. **Adv Virus Res**, v. 77, p. 1-39, 2010.

DEEN, J. L.; HARRIS, E.; WILLS, B.; BALMASEDA, A.; HAMMOND, S. N.; ROCHA, C.; DUNG, N. M.; HUNG, N. T.; HIEN, T. T.; FARRAR, J.J. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, p. 170-173, 2006.

GUBLER, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 11, p. 480- 496, 1998.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and Dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v.11, p. 301-11, 2001.

MARGOLIUS, H. S. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hypertension**, v. 26, n. 2, p. 221-229, ago. 1995.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, dez. 2002.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brazil, 2008. 569 p.

ROSENKILDE, M. M.; SCHWARTZ, T. W. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. **APMIS**, v. 112, n. 7-8, p. 481-495, jul-ago. 2004.

LOCATI, M.; MURPHY, P. M. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. **Annu Rev Med.**, v. 50, p. 425-440, 1999.

DORNER, B. G.; DORNER, M. B.; ZHOU, X.; OPITZ, C.; MORA, A.; GÜTTLER, S.; HUTLOFF, A.; MAGES, H. W.; RANKE, K.; SCHAEFER, M.; JACK, R. S.; HENN, V.;

KROCZEK, R. A. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on crosspresenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 823-833, nov. 2009.

GRAHAM, K. L.; ZABEL, B. A.; LOGHAVI, S.; ZUNIGA, L. A.; HO, P. P.; SOBEL, R. A.; BUTCHER, E. C. Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease. **J Immunol.**, v. 183, n. 10, p. 6717-23, 2009.

THELEN, M.; STEIN, J. V. How chemokines invite leukocytes to dance. **Nat Immunol**, v. 9, n. 9, p. 953-9, set. 2008.

BRITO, R. G. **Imunopatologia da dengue: receptores de quimiocinas CC e células iNKT**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1223-1229, 2009.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 429-436, 2006.

SINGLA, M.; KAR, M.; SETHI, T.; KABRA, S. K.; LODHA, R.; CHANDELE, A.; MEDIGESHI, G. R. Immune response to dengue virus infection in pediatric patients in New Delhi, India—association of viremia, inflammatory mediators and monocytes with disease severity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, 2016.

FERREIRA, A. C. **Epidemiologia espacial da dengue em Araraquara, São Paulo, 2008 a 2015**. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

CHAGAS, D. C. **Erradicando doenças**: De projeto internacional ao Sistema de Vigilância Epidemiológica - a erradicação da varíola no Brasil (1900-1970). 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em História das Ciências e da Saúde) – Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008.

FERNANDES, A.I.V. **Avaliação da acurácia dos critérios para definição de caso de febre hemorrágica da dengue e dengue grave utilizados pela organização mundial de saúde de acordo com as classificações tradicional e revisada**. 216f. Tese (Doutorado em medicina tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

FIOCRUZ. **Dengue, vírus e vetor**. 2017. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>>. Acesso em: 10 out. 2017.

HEALTHMAP. <<http://www.healthmap.org/dengue/pt/>>. Acesso em: 30 de jan. de 2017.

MESQUITA JR., D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; CRUVINE, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; DA SILVA, N. P. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

GANDINI, M. **Dengue e imunologia inata estudo dos fatores antivirais e citotóxicos em células dendríticas plasmacitoides e células NK durante a infecção pelo vírus Dengue**. 2014. 207 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.